

Zymografie

1. Příprava gelu

- složení aparatury
- příprava **rozdělovacího gelu (10%)**:

počet gelů	1	2	4
objem	6 ml	12 ml	24 ml
40% akrylamid	1,5 ml	3 ml	6 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,6)	1,5 ml	3 ml	6 ml
H₂O	2,94 ml	5,88 ml	10,6 ml
100× Gelatin	60 μl	120 μl	240 μl
10% SDS	60 μl	120 μl	240 μl
10% APS	20,28 μl	40,56 μl	81,12 μl
TEMED	5,25 μl	10,5 μl	21 μl

želatinu rozehtát na 55 °C, nanášet s odstříhnutou špičkou,
po přidání horké želatiny roztok intenzivně zvortexovat

- nanést asi 4,5 ml + zalít 350 μl isopropanolu
- nechat zatuhnout, vylít isopropanol, vysušit
- příprava „**stacking**“ gelu:

počet gelů	1	2	4
objem	2 ml	4 ml	8 ml
40% akrylamid	189 μl	378 μl	756 μl
2 M Tris-HCl (pH 6,8)	124 μl	248 μl	496 μl
H₂O	1,64 ml	3,28 ml	6,56 ml
10% SDS	20 μl	40 μl	80 μl
10% APS	17 μl	34 μl	68 μl
TEMED	2 μl	4 μl	8 μl

- nanést do plna (≈ 1,5 ml), vložit hřebínek

2. Příprava vzorků

- vzorky smíchat s loadovací barvou (5× ZYMO Loading Buffer) – v poměru 4 : 1
- pozitivní kontrola – FBS – 30 μ l 1%FBS (živočišná tkáň, MMP2)

3. Elektroforéza – SDS-PAGE

- složit aparaturu a zalít 1× Running bufferem
- nanést ladder (4 μ l)
- vzorky – množství vzorku záleží na zdroji a koncentraci proteinu
- spustit elektroforézu: 120V/ \approx 120 min
- během elektroforézy si připravit Development buffer a Triton-X-100
- po skončení elektroforézy: vylít pufr a skla opláchnout vodou

4. Vývoj a barvení gelů

- separační gel promýt 2 \times 15 min. v 2,5% Triton-X-100 na kývačce (odstranění SDS a aktivace MMP)
- 2 \times promýt vodou (odstranění Tritonu)
- gel do vyvíjecího pufru (Development buffer) – na kývačce při laboratorní teplotě 15 min., poté do inkubátoru 37 $^{\circ}$ C/ 16–20 hod./RPM 70
- gel do odbarvovacího roztoku (Fixing/Destaining solution) na kývačce 15 min.
- gel opláchnout vodou
- gel do barvicího roztoku (Staining solution) – na kývačce min. 2 hod. (roztok recyklovat)
- gel do odbarvovacího roztoku – než jsou pásma jasná a kontrastní s pozadím (obvykle 2 \times 15 min.)
- 2 \times promýt vodou (zastavení odbarvování)
- uchování gelů ve vodě před pořízením fotografie

Složení roztoků, pufrů

100× Gelatin (rozpustit na vodní lázni nebo v mikrovlnce, uchovat při -20 °C, alikvóty po 1 ml)	
želatina	1 g
voda	ad 10 ml

5× ZYMO Loading Sample Buffer		
		finální koncentrace
2M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml	0,25 M
SDS	1 g	10%
glycerol	3 ml	30%
0,5% bromfenolová modř	0,8 ml	0,04%
voda	ad 10 ml	

10× Running buffer (1 L) (Tris-glycine SDS electrophoresis buffer)			
		finální koncentrace (10×)	finální koncentrace (1×)
Tris base	30,3 g	250 mM	25 mM
glycin	144,1 g	1,92 M	192 mM
SDS	10 g	1% (w/v)	0,1% (w/v)
voda	ad 1 L		
1× Running buffer (1L)	100 ml 10× buffer + 900 ml vody		

2,5% Triton-X-100 (Zymo wash) (připravit čerstvé)	
Triton-X-100	2,5 ml
voda	ad 100 ml

Development buffer (připravít čerstvé)			
	100 ml	200 ml	finální koncentrace
Tris base	0,606 g	1,211 g	50 mM (uprav na pH 8,8)
CaCl ₂	0,0735 g	0,147 g	5 mM
NaN ₃	0,02 g	0,04 g	0,02%
Triton X	0,5 ml	1 ml	0,5%
voda	ad 100 ml	ad 200 ml	

Fixing/Destaining solution (0,5 L)	
voda	225 ml
kyselina octová	50 ml
methanol	225 ml
poměr 4,5 : 1 : 4,5	
Staining solution	0,1% Coomasie brilliant blue (w/v) ve Fix/Destain solution